

## LA ATENCIÓN INTEGRAL A LOS DSDs DESDE LA PERSPECTIVA MÉDICA

# Avances en el diagnóstico clínico, bioquímico y molecular de las 46,XY Diferencias en el Desarrollo Sexual

## Advances in clinical, biochemical, and molecular diagnostics of 46,XY Different Sex Development

Amaia Rodríguez-Estévez, Gema Grau, Amaia Vela, Itxaso Rica

*Endocrinología Pediátrica. Hospital Universitario de Cruces. Barakaldo, Vizcaya.*

### Resumen

Las Diferencias en el Desarrollo Sexual (DSD) pueden manifestarse como genitales ambiguos al nacer con una prevalencia de 1 de cada 5000 nacimientos o en pubertad con amenorrea primaria. La evaluación y manejo de esta compleja patología debe llevarse a cabo por un equipo multidisciplinar compuesto por expertos en diferentes ámbitos. El primer paso diagnóstico en un recién nacido con anomalía genital debe ser la valoración del cariotipo y de la 17-hidroxiprogesterona. La clasificación de las DSD se basará en el cariotipo. En el caso de 46,XY DSD, la hormona anti-Mülleriana (AMH) puede informarnos de la presencia de teste. La valoración hormonal del teste debe realizarse mediante un estímulo con HCG en período prepuberal, o en situación basal durante la minipubertad (1-4 mes de vida). La presencia de restos müllerianos en la ecografía indicará en 46,XY DSD la ausencia de teste por anorquia o disgenesia gonadal, o un Síndrome de Conductos de Müller Persistente. La orientación inicial se basará en una alteración en el desarrollo de la gónada, o en una alteración en la síntesis o acción de los andrógenos. El estudio hormonal es complejo al tratarse de una gónada quiescente y por las limitaciones de los inmunoensayos con los que se miden habitualmente los esteroides sexuales. El diag-

nóstico molecular de los 46,XY es insuficiente en la actualidad, especialmente en los casos asignados al sexo masculino. Sin embargo, los avances en genética molecular de los últimos años (MLPA, Arrays-CGH y Secuenciación Masiva) resultan prometedores identificándose genes nuevos así como microduplicaciones/microdeleciones del genoma, que no se objetivaban con las técnicas tradicionales. El diagnóstico preciso de las DSD permitirá que en un futuro podamos mejorar los tratamientos actuales en función de su etiología, una vez conocidos los resultados a largo plazo de su evolución clínica (disforia de género, riesgo tumoral de la gónada, etc).

*Palabras clave: 46,XY diferencias del desarrollo sexual, evaluación*

### Abstract

Disorders of sex development (DSD) can be displayed as ambiguous genitalia at birth, with prevalence of 1:5000, or as primary amenorrhea in puberty. Evaluation and management of this complex disease should be carried out by a multidisciplinary team. The first step for the diagnosis of a newborn with genital anomaly should be the assessment of the karyotype and the evaluation of the 17-hydroxyprogesterone. The classification of DSD is based on the karyotype. In 46,XY DSD, the anti-Müllerian hormone (AMH) informs on the presence of testis. Moreover, hormonal assessment of the testis requires an HCG test in prepuberal period, or a basal assessment during mini-puberty age (1-4 month old). The presence of Müllerian structures in 46,XY DSD indicates anorchia, gonadal dysgenesis or persistent Müllerian

### Correspondencia:

Amaia Rodríguez-Estévez  
Endocrinología Pediátrica, Hospital Universitario de Cruces,  
Barakaldo, Vizcaya  
E-mail: amaya.rodriguezestevez@osakidetza.net  
E-mail: amroya12@yahoo.es

Tabla 1. Clasificación de DSD.

Formas Mixtas de Cromosomas	46,XY DSD	46,XX DSD
45,X (S Turner y variantes)	Alteraciones del Desarrollo Gonadal (testicular): 1.Disgenesia Gonadal Completa (S Swyer); 2.Disgenesia Gonadal Parcial; 3.Regresión Gonadal; 4.Ovotesticular DSD	Alteraciones del Desarrollo Gonadal (ovárico): 1.Ovotesticular DSD; 2. DSD testicular (ej SRY+; duplicación SOX9); 3.Disgenesia Gonadal
47,XXY (S Klinefelter y variantes)	Alteraciones en la Síntesis o Acción de Andrógenos: 1.Deficiencia en Síntesis (5 $\alpha$ R2, 17 $\beta$ -HSD-3, otros déficits) 2. Deficiencia en Acción (CAIS,PAIS) 3. Deficiencia en Receptor de LH (Aplasia/Hipoplasia de Células de Leydig); 4.Alteraciones del gen o receptor de AMH (S Conductos de Müller Persistentes)	Exceso de Andrógenos: 1. Fetal (ej Deficiencia de 21-Hidroxilasa, Deficiencia de 11-Hidroxilasa); 2.Fetoplacentaria (Deficiencia de Aromatasa o de POR); 3.Maternal (Luteoma, Exógenos, etc)
45,X/46,XY (MGD u Ovotesticular DSD)		Otras: Extrofia de Cloaca, Atrisia Vaginal, MURCS y otros síndromes
46,XX/46,XY (Quimera u Ovotesticular DSD)		

5 $\alpha$ R2: deficiencia de 5-a-reductasa -2; 17 $\beta$ -HSD-3: 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa-3; CAIS,PAIS: Insensibilidad Completa a Andrógenos; POR: P450 oxido-reductasa; MURCS: anomalías Mülllerianas, renales, cervico-torácicas.

Ducts Syndrome. Thus, the initial estimation is based on a subclassification: A. Disorders of Gonadal Development, or B. Disorders in Androgen Synthesis or Action. Hormonal evaluation is complex, because of the quiescent gonad and the immunoassay limitations for sex steroids analysis. Presently, molecular diagnosis of 46,XY is insufficient, especially in male assigned cases. However, advances in molecular genetics (MLPA, CGH Arrays and Massive Sequencing) in the last years are promising, due to the identification of new genes and microduplications/microdeletions of the genome, which are not observed by traditional techniques. Accurate diagnosis of DSD may allow the improvement of present treatments based on the etiology of the disease, and once long-term clinical progress (gender dysphoria, gonadal tumor risk, etc) were known.

**Key Words:** *46,XY disorders of sexual development, evaluation*

## Introducción

Las Diferencias en el Desarrollo Sexual (DSD) comprenden un amplio espectro de anomalías en las que existe una discordancia en los criterios cromosómico, gonadal y fenotípico que definen el sexo.

La aproximación diagnóstica inicial se establece con el cariotipo, que es la base de la nueva clasifi-

cación (Tabla 1) de las DSD acordada en el Consenso de Chicago de 2006 <sup>(1)</sup>; asimismo en este consenso se desechó el uso de términos que pudieran ser peyorativos como “pseudohermafroditismo”, “hermafroditismo”, “sex-reversal”, “intersexo”, etc. adecuando la terminología (Tabla 2) de estas entidades

El diagnóstico es difícil, especialmente en las 46,XY DSD asignadas al sexo masculino, en las que el diagnóstico molecular no es frecuente <sup>(2)</sup>. Por otra parte, el tratamiento más adecuado a las necesidades de cada paciente debiera estar basado en los conocimientos a largo plazo de cada una de estas patologías, con un diagnóstico preciso. Para que todos estos objetivos se cumplan se requiere de la coordinación de un equipo multidisciplinar con experiencia en DSD, en el que los padres han adquirido un papel fundamental. Deben ser informados con detalle de los beneficios y perjuicios de las diferentes opciones terapéuticas (asignación de género, gonadectomía, riesgo tumoral de la gónada...) y participar en la toma final de decisiones.

## Diagnóstico Clínico

El diagnóstico etiológico de las DSD es fundamental a la hora de decidir el tratamiento. El conocimiento científico de los resultados a largo plazo del tratamiento de una DSD concreta permitirá en el futuro,

Tabla 2. Nomenclatura: Consenso Chicago 2006.

Previo	Propuesto
Intersexo	DSD
Varón Pseudohermafrodita, Varón XY Subvirilizado	46,XY DSD
Mujer Pseudohermafrodita, Mujer XX Virilizada o Masculinizada	wW46,XX DSD
Hermafrodita Verdadero	DSD Ovotesticular
Varón XX o XX sex-reversal	46,XX DSD Testicular
XY sex-reversal	46,XY Disgenesia Gonadal Completa

que orientemos de una forma más adecuada el tratamiento. En los últimos años hemos asistido a avances importantes en el conocimiento de las bases moleculares de la determinación y diferenciación sexual; con un incremento en el diagnóstico genético de las DSD.

El primer paso diagnóstico es identificar la DSD, que deberemos sospechar ante la presencia de:

**1. Ambigüedad genital clara.** Puede presentarse de diferentes formas:

- a. Genitales femeninos con hipertrofia de clítoris y fusión labial posterior (Figura 1)
  - Se considera Clitoromegalia la anchura del clítoris superior a 6 mm y/o la longitud mayor de 9 mm
  - La Fusión Labial Posterior se valora mediante el índice ano-genital (distancia ano-fourchette posterior/ano-base de clítoris), estando presente cuando este índice es superior a >0,5 (Figura 1)
- b. Genitales femeninos con masa en región inguinal/labios mayores: forma frecuente de presentación del Síndrome de Insensibilidad a Andrógenos –SIA-
- c. Genitales masculinos con testes no descendidos bilaterales
- d. Genitales masculinos con micropene
- e. Genitales masculinos con hipospadias proximal (escrotal)
- f. Genitales masculinos con hipospadias distal o medio asociado a teste no descendido (unilateral)

En 46,XY DSD el grado de “subvirilización” genital se debe valorar mediante el Índice de Masculinización Externa (EMS=External Masculinization Score)

Figura 1. Fusión Labial Posterior: Índice ano-genital >0,5.

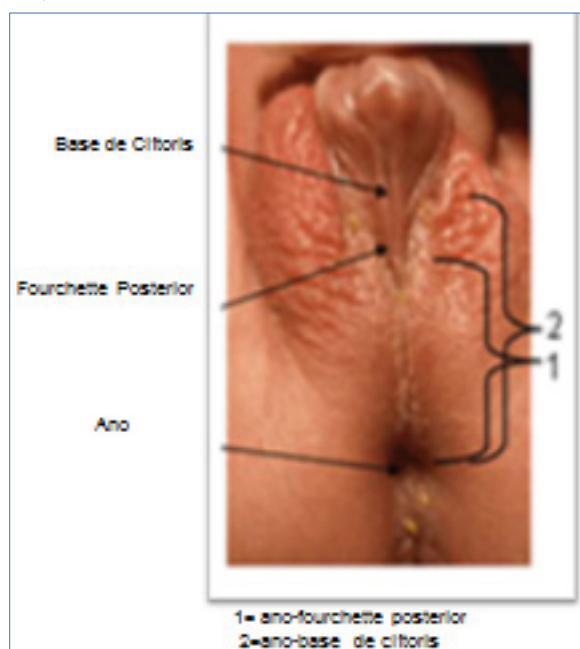


Figura 2. Escala de Masculinización Externa (EMS) en 46,XY

	Fusión Escrotal	Micropene	Meato Uretral	Gónada Derecha	Gónada Izquierda
3	SI	NO	Normal		
2.5					
2			Distal		
1.5				Escrotal	Escrotal
1			Medio	Inguinal	Inguinal
0.5					
0	NO	SI	Proximal	Ausente	Ausente

o escala de Quigley(Figura 2) con una puntuación total de 12 puntos.

**2. Historia familiar de DSD:** por ejemplo en el SIA, valorar el antecedente familiar de una tía materna con amenorrea primaria y sin descendencia.

**3. Discordancia entre apariencia genital y cariotipo:**

- a. Fenotipo genital masculino en 46,XX DSD: la causa más frecuente es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita –HSC- con una prevalencia de 1/14000 RN
- b. Fenotipo genital femenino normal en 46,XY DSD: el diagnóstico más frecuente es el Síndrome Insensibilidad Completa a Andrógenos (SIA), y debemos pensar en esta entidad ante una lactante con “hernia inguinal” con gónada

palpable (teste), o ante una mujer con amenorrea primaria, talla alta, desarrollo mamario normal, y vello corporal escaso o ausente

Tabla 3. Valores de AMH en varones y mujeres de 0-16 años

**Table 1.** Serum AMH (pmol/l) concentration in boys and girls from birth to 16 years. All median AMH values in boys are significantly higher than that in girls for that respective age band ( $P < 0.0001$ )

	0-1 year	1-4 year	5-8 year	9-12 year	13-16 year
<b>Boys</b>					
n	32	31	32	32	27
Median AMH	640	545	598	240	55
3rd centile	184	173	50	65	28
10th centile	267	230	202	87	30
90th centile	1019	1285	852	784	490
97th centile	1472	1372	897	851	576
<b>Girls</b>					
n	24	23	20	39	24
Median AMH	1.9	5.7	7.7	12.1	11.8
3rd centile	0.2	1.5	0.3	0.2	0.2
10th centile	0.2	2.1	0.7	1.9	1.2
90th centile	20.2	10.8	25.5	40.0	28.5
97th centile	30.4	12.6	35.5	50.0	37.2

Ahmed SF et al. Clin Endocrinol 2010; 72: 814.

### Clasificación

El paso siguiente a la identificación será la clasificación de la DSD que se realizará de acuerdo al cariotipo (tabla 1). La información que aporta el cariotipo está limitada a las anomalías cromosómicas (numéricas o estructurales). Una vez clasificada la DSD, la aproximación diagnóstica será diferente en los 3 grupos de DSD: 46 XY DSD, 46,XX DSD y Formas Mixtas de Cromosomas.

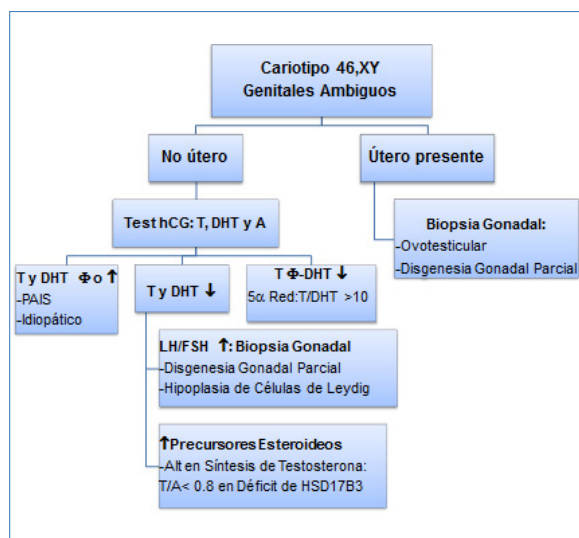
### Diagnóstico bioquímico y de imagen en 46,XY DSD

#### Estudios de Primera Línea

Ante un recién nacido (RN) con genitales ambiguos debemos realizar un estudio inicial (Figura 3) que incluya:

- **Cariotipo y/o valoración SRY por FISH** (fluorescence in situ hybridization). Este último método con resultados en un plazo corto de tiempo.
- **17-Hidroxiprogesterona** (17OH-P) y electrolitos: la determinación de 17-OHP es urgente en un RN fenotípicamente varón con testes no palpables bilaterales para descartar una HSC.
- **Hormona Anti-Mülleriana (AMH)**: es una analítica sencilla que permite determinar la presen-

Figura 3. Algoritmo Diagnóstico en Genitales Ambiguos en 46,XY



cia de células de Sertoli y, por lo tanto de testículo. Los valores de un varón son claramente superiores a los de una mujer (3). Así, en el primer año de vida el percentil 3 de AMH de un varón es 25.8 ng/ml, muy superior al percentil 97 de una mujer de 4.2 ng/ml (tabla 3).

La ausencia de AMH en presencia de cariotipo 46,XY puede indicar:

- 1.- Anorquia
- 2.- 46,XY con Disgenesia Gonadal Completa (DGC)
- 3.- Síndrome de Conductos de Müller Persistente por mutación en el gen AMH

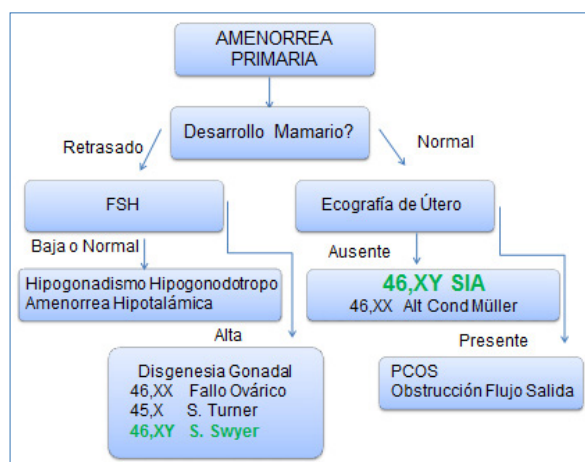
- **Ecografía:** la presencia de útero en 46,XY DSD orientará el diagnóstico hacia una de las siguientes entidades:

- 1.- DSD Ovotesticular
- 2.- DGC
- 3.- Síndrome de Conductos de Müller Persistente, por mutación en el gen de AMH o en el de su receptor.

Cuando los resultados de la ecografía no son concluyentes, se debe recurrir a otras pruebas diagnósticas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), el genitograma o la laparoscopia.

Los resultados del cariotipo (o FISH) y de la ecografía deberían estar disponibles en las primeras 48 horas. Aunque el análisis por FISH con sondas específicas X- e Y- es útil para la evaluación inicial, es recomendable realizar también un cariotipo que permita diagnosticar mosaicismos. También debe repetirse el cariotipo en caso de discordancia con el cariotipo prenatal.

Figura 4. Algoritmo Diagnóstico en Amenorrea Primaria.



Además de 17OH-progesterona y AMH pueden realizarse otros estudios hormonales (testosterona, cortisol, androstendiona, gonadotropinas y esteroides urinarios), y se compararan los resultados con los valores de referencia del ensayo analítico y con la edad del recién nacido. Estos resultados también deberían estar disponibles en una semana.

Cuando la forma de presentación de una 46,XY DSD es una mujer con amenorrea primaria, la evaluación diagnóstica no requerirá de pruebas de estímulo, siendo fundamental en el diagnóstico la presencia (Disgenesia Gonadal Completa –DGC–) o ausencia (Síndrome de Insensibilidad a Andrógenos –SIA–) de útero. En el caso de una DGC el estudio hormonal basal mostrará ausencia de esteroides sexuales y un hipogonadismo hipergonadotropo. En el caso de un SIA, presentará valores elevados de LH y testosterona; además el desarrollo mamario será adecuado (Figura 4).

### Estudios de Segunda Línea:

Deben orientarse en función de los hallazgos de los estudios previos. En la mayoría de los casos, los estudios de primera línea pueden ser suficientes para la asignación de sexo.

En esta segunda fase podemos estudiar la síntesis de andrógenos en el neonato, lactante o niño prepuber mediante la realización de una **prueba de estímulo de HCG** <sup>(4)</sup>, con valoración de testosterona, androstendiona (A) y dihidrotestosterona (DHT). El test más usado es HCG intramuscular 1000-1500 unidades 3 días consecutivos. Si la respuesta es pobre puede completarse con un test prolongado: 1500 unidades durante 3 días consecutivos la primera semana seguidos de 1500 unidades (2 días/semana) en la segunda y tercera semana. En lactantes y niños mayores con un eje gonadotrópico más activo puede ser suficiente con un test corto de

HCG. Debe medirse la testosterona, androstendiona y dehidrotestosterona los días 1 y 4 del test corto, siendo los valores más discriminativos de A y DHT los del 4º día (a las 24 horas de la última dosis de HCG). Se considerará una respuesta adecuada en el test corto de HCG un valor en el 4º día de testosterona superior a 100 ng/dl, T/A >0.8 y T/DHT <10

También puede ser necesario realizar un test de LHRH (luteinising hormone-releasing hormone), test de ACTH (adrenocorticotrophic hormone), valoración de renina y aldosterona; y estudio de esteroides urinarios por CG-MS (gas chromatography-mass spectrometry).

La medición de colesterol sérico y 7-dehidrocolesterol son útiles en el diagnóstico del Síndrome de Smith-Lemli-Opitz.

- **Imagen:** ecografía, RMN, genitograma, cisturoretroscopia, laparoscopia, etc.
- **Anatomía Patológica:** la biopsia gonadal puede ser útil para diferenciar entre teste y ovario maduro, ovoteste o gónada disgenética. Con frecuencia se plantea la duda de si una toma de biopsia representa toda la gónada.
- **Genética:** debe realizarse un Cariotipo de alta-resolución; si es posible también de diferentes tejidos (sangre, piel, gónadas...). Además conviene guardar DNA para ulteriores estudios moleculares.

### Dificultades en el estudio diagnóstico de 46,XY DSD

El estudio hormonal es complejo en la infancia, y precisa del estímulo de la gónada. Este puede realizarse mediante el test de HCG o aprovechando el periodo de activación fisiológica del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal que tiene lugar durante el periodo denominado “minipubertad”. Este periodo de activación del eje alcanza su pico en la semana 4-10 de vida, y retorna a valores prepuberales a los 6 meses de edad.

Desafortunadamente, los resultados hormonales con frecuencia son poco concluyentes tanto en estudios basales –en “minipubertad”– como tras estímulo con HCG.

Se han publicado pacientes con mutación en el receptor de andrógenos (AR) con una respuesta inadecuada o insuficiente al test de estímulo con HCG <sup>(4)</sup>. De la misma forma los valores “teóricos” diagnósticos de los índices de T/DHT (>10) en el déficit de 5-alfa Reductasa (5aR2) y de A/T (<0.8) en el déficit de 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa-3

(17 $\beta$ -HSD-3) no son suficientemente sensibles; habiéndose objetivado mutación en estos genes en pacientes con índices considerados "normales" <sup>(5,6)</sup>.

Los métodos utilizados para la medición de hormonas esteroideas sexuales en la mayoría de los laboratorios son inmunoensayos automatizados. Estos métodos presentan problemas por la falta de sensibilidad para medir concentraciones bajas, por ejemplo la testosterona en niños; y por la especificidad incompleta de los anticuerpos que provoca reacciones cruzadas al medir un esteroide particular. Estas limitaciones de los inmunoensayos son bien conocidas y para solventarlas se han desarrollado Métodos de Referencia basados en cromatografía líquida con espectrometría de tándem masas (LC-MS/MS) con sensibilidad y especificidad adecuadas (permite diferenciar cada uno de los esteroides). Sin embargo el coste elevado de los instrumentos, la complejidad y laboriosidad de los métodos han impedido hasta el momento su uso en los laboratorios clínicos.

### Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular es la norma en 46,XX DSD, encontrando en la mayoría las mutaciones en el gen CYP21A2 diagnóstica de HSC. Sin embargo, en las 46,XY DSD el diagnóstico etiológico sigue siendo complejo. La excepción son los casos de SIA completo con fenotipo femenino en los que la mutación en el gen del receptor de andrógenos (HAR) se objetiva en el 80% <sup>(7)</sup>. Por el contrario, en los casos de 46,XY DSD asignados al sexo masculino, el diagnóstico molecular es poco frecuente, observando en un 20% de los casos mutación en AR, un 10% en NR5A1/SF1 y un 5% en MAMLD1 <sup>(8)</sup>.

La secuenciación Sanger permite el descubrimiento de nuevos genes implicados en el desarrollo de DSD, y se secuencian genes implicados en la determinación y diferenciación gonadal (estudio del gen "sospechoso" de producir la DSD en función del fenotipo clínico y hormonal). Con el objetivo de mejorar el rendimiento diagnóstico, se diseñan algoritmos de estudio que consiguen hasta un 69% de diagnósticos moleculares en 46,XY DSD (20/29) con asignación a ambos sexos (8 mujeres/21 varones) <sup>(9)</sup>.

Sin embargo, y a pesar de estos resultados prometedores, el diagnóstico molecular de las 46,XY DSD es insuficiente. Se debe, en parte, a las dificultades que plantean los estudios hormonales y, por otra, a la variabilidad fenotípica de las distintas DSD (mismo fenotipo—por ejemplo mujer con amenorrea primaria— para mutaciones en distintos genes; o por el contrario, fenotipos muy diferentes para mutaciones en el mismo gen —en el caso del SIA con un amplio espectro de fenotipos desde una mujer con ameno-

rra primaria a un varón con azoospermia, con grados intermedios de genitales ambiguos-).

Los avances en la última década en genética molecular (MLPA, Arrays-CGH y Secuenciación Masiva – next-generation sequencing o NGS-) han permitido aumentar el diagnóstico molecular de estas entidades.

Con el advenimiento del MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) se facilita la amplificación y detección de múltiples dianas permitiendo amplificar muchas secuencias (hasta 40). Detecta duplicaciones y deleciones de genes. En el caso de 46,XY DSD con Disgenesia Gonadal Completa, se han encontrado con esta técnica duplicaciones en NROB1 (DAX1) <sup>(10)</sup> y WNT4, o mutaciones con ganancia de función en MAP3K1 que se han añadido a otras causas ya conocidas de 46,XY DGC (mutaciones con pérdida de función en genes SRY, NR5A1, DHH, etc.). Se han comercializado MLPA específicos para el estudio de la determinación gonadal (SOX9, 17q24.3, NR5A1, 9p33, WNT4, 1p36.12, NROB1, Xp21.2) y del desarrollo gonadal (DMRT1, CYP17A1, SRD5A2, HSD17B3).

Los array-CGH (a-CGH), que aparecen posteriormente van a permitir el estudio de microdeleciones/microduplicaciones del genoma; son capaces de identificar deleciones crípticas o duplicaciones de regiones genómicas pequeñas (150 Kb o incluso genes) que no son objetivados por los métodos citogenéticos tradicionales (cariotipo y FISH). Además, identifican alteraciones en el número de copias de genes conocidos y noveles. Entre los genes ya conocidos, se ha descrito una deleción upstream de SOX9 en 1 caso de 46,XY DSD <sup>(11)</sup>, deleciones en NR5A1 en varios pacientes con 46,XY DSD (12, 13) y deleción parcial de DMRT1 en un caso de 46,XY Ovotesticular <sup>(14)</sup>. También se han observado duplicaciones del cromosoma X que incluyen el gen SOX3 en 46,XX DSD Testicular <sup>(15)</sup>, que sugieren que la sobreexpresión de SOX3 puede sustituir la expresión de SRY y provocar el desarrollo testicular. Además con los a-CGH se han identificado duplicaciones de regiones cromosómicas que contienen genes noveles (PIP5K1B; PRKACG y FAM189A2) candidatos a ser la causa de disgenesia gonadal 46,XY <sup>(16)</sup>, también duplicaciones de SUPT3H y deleción de C2ORF80 en dos hermanos <sup>(16)</sup> con 46,XY disgenesia gonadal, así como una deleción de varios exones de WWOX en un caso de 46,XY DSD <sup>(17)</sup>.

Para finalizar, con la secuenciación del genoma humano completo (NGS) se han identificado variantes en el número de copias (copy number variations – CNVs-) <sup>(18)</sup>, recombinaciones estructurales, variantes de un único nucleótido (single nucleotide variants –SNVs-) e inserciones/deleciones cortas (<1Kb) denominadas "indels" (19,20). Esta secuen-

ciación a gran escala ofrece importantes ventajas en el diagnóstico y una disminución en el coste de los estudios genéticos (la secuenciación del genoma completo en breve tendrá un precio asequible, similar al de realizar una secuenciación estándar de Sanger de 2-3 genes); pero también plantea numerosas dudas sobre la patogenicidad de los hallazgos que se derivan de la misma. La mayoría de las mutaciones que producen enfermedad se atribuyen a variaciones en la secuencia o en el número de copias (copy number variations o CNV) que afectan a regiones codificantes de los genes.

Sin embargo, el manejo de estos hallazgos y su probable patogenicidad es difícil de interpretar. Debemos identificar las variantes previamente descritas en la literatura como causa de DSD. Para ello se comparan todos los SNVs (single-nucleotide variants) e INDELs (small insertions and deletions) codificantes con el HGMD public (Human Gene Mutation Database) o con otras bases de datos.

La NGS se puede realizar con diferentes aproximaciones, mediante el estudio del genoma completo, del exoma completo (aproximadamente unos 22.000 genes) o por medio de paneles de genes específicos de DSD. Para el estudio de estos últimos, se han propuesto también **paneles de genes** dirigidos, ya sea a la esteroidogénesis o al desarrollo de la gónada: a.- Genes de vía de Andrógenos: AR, 5aR2, etc; b.- Genes frecuentes en el desarrollo de la Gónada: NR5A1, SRY, MAP3K, etc.

Estos paneles de genes, en contraposición a la secuenciación del genoma completo, no permiten identificar genes noveles de DSD; sin embargo, disminuyen la posibilidad de hallazgos incidentales no relacionados con la DSD. Cuando los paneles de genes probables de producir DSD no identifican la causa genética, o en aquellas patologías cuya base molecular es desconocida, como el agonadismo, la **secuenciación completa del genoma** puede ser una opción excelente.

## Conclusiones

El primer paso en el diagnóstico de una DSD es su identificación clínica. En el caso de un neonato con presencia de anomalías genitales debe realizarse un estudio de cariotipo (o FISH) y 17-OHP que debiera estar disponible en 48 horas. Es importante descartar enfermedades que puedan poner en peligro la vida del/la recién nacido/a como la HSC con cuadro de pérdida salina o la hipoglucemia secundaria a hipopituitarismo. Los valores de AMH en rango de varón determinan la presencia de un teste funcionante, con la excepción de la mutación en el gen de AMH. El estudio hormonal de la gónada antes de la pubertad requiere de un test de estímulo

(HCG); puede utilizarse el periodo de activación fisiológico del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (minipubertad) para valorar la función hormonal en situación basal.

Con los avances actuales en genética molecular, el conocimiento de la causas de DSD será muy superior en un futuro próximo. Estos avances ayudarán a que con resultados a largo plazo de cohortes de pacientes con la misma alteración molecular, podamos adecuar los tratamientos actuales (asignación de sexo, gonadectomía...) en función de la identidad de género probable en este grupo, del riesgo tumoral de la gónada, etc; éstos son problemas transcendentales que se plantean en el manejo actual de los pacientes con DSD.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses alguno con respecto a este artículo.

## Referencias Bibliográficas

1. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatrics* 2006;118: e488
2. Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *British Medical Bulletin* 2013; 106: 67-89
3. Ahmed SF, Keir L, McNeilly J, Galloway P, O'Toole S, Wallace AM. The concordance between serum anti-Mullerian hormone and testosterone concentrations depends on duration of hCG stimulation in boys undergoing investigation of gonadal function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72: 814-819.
4. Ahmed SF, Cheng A, Hughes IA. Assessment of gonadotrophin-gonadal axis in androgen insensitivity syndrome. *Arch Dis Child* 1999; 80: 324-329
5. Maimoun L, Philibert P, Cammas B. Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 $\alpha$ -reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 296-307
6. Ahmed SF, Iqbal A, Hughes IA. The testosterone:androstenedione ratio in male undermasculinization. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 53: 697-702
7. Ahmed SF, Cheng A, Dovey L. Phenotypic fea-

- tures, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:658-665
8. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill J, et al. Screening of MAMLD1 Mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and Functional Analysis of Two New Mutations. *PLoS ONE* 1 March 2012 | Volume 7 | Issue 3 | e32505
  9. Palmer BW, Wisniewski AB, Schaeffer TL, Mallappa A, Tryggestad JB, Krishnan S, et al. A model of delivering multi-disciplinary care to people with 46 XY DSD. *Journal of Pediatric Urology* 2012; 8: 7-16.
  10. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994; 7: 497-501
  11. Lecointre C, Pichon O, Hamel A, et al. Familial acampomelic form of campomelic displasia caused by a 960 kb deletion upstream of SOX9. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 1183-1189
  12. Harrison SM, Campbell IM, Keays M et al. Screening and familial characterization of copy-number variations in NR5A1 in 46,XY disorders of sex development and premature ovarian failure. *Am J Med Genet A* 2013; 161: 2487-2494
  13. Brandt T, Blanchard L, Desai K et al. 46,XY disorder of sex development and developmental delay associated with a novel 9q,33.3 microdeletion encompassing NR5A1. *Eur J Med Genet* 2013; 56:619-623.
  14. Ledig S, Hiort O, Wunsch L, Wieacker P. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY Ovotesticular disorder of sexual development. *Eur J Endocrinol* 2012; 167: 119-124
  15. Sutton E, Hughes J, White S et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 2011; 121: 328-341
  16. Norling A, Linden Hirschberg A, Iwarsson E, Persson B, Wedell A, Barbaro M. Novel candidate genes for 46,XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1 M array-CGH platform. *Eur J Med Genet* 2013; 56: 661-668.
  17. White S, Hewitt J, Turbitt E, et al. A multi-exon deletion within WWOX is associated with a 46,XY disorder of sex development. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 348-351
  18. White S, Ohnesorg T, Notini A, et al. Copy number variation in patients with disorders of sex development due to 46,XY gonadal dysgenesis. *PLoS One* 2011; 6: e177793
  19. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 2008; 452: 872-876
  20. Ostrer H. Changing the game with whole exome sequencing. *Clin Genet* 2011; 80: 101-103